

VU Research Portal

Stress to progress

Boot, M.

2017

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Boot, M. (2017). *Stress to progress: learning from antibiotic stress responses to accelerate tuberculosis drug discovery*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

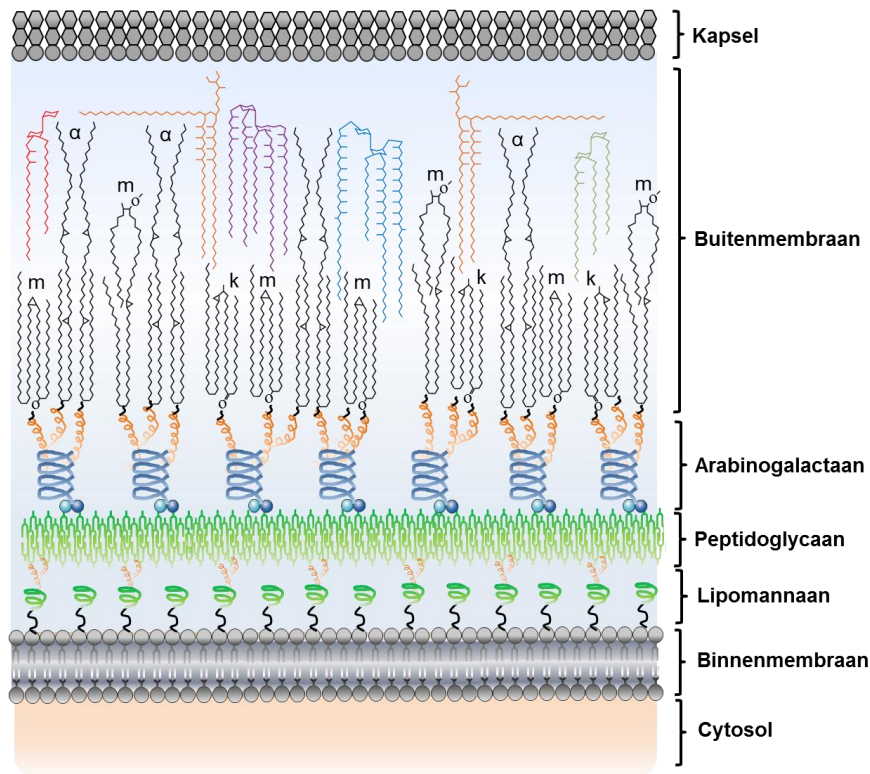
vuresearchportal.ub@vu.nl

Analyseren van de stressreactie van de tuberculose bacterie om onderzoek naar nieuwe antibiotica te versnellen

Wat is tuberculose en waarom doen wij er onderzoek naar?

Tuberculose (TBC) wordt veroorzaakt door de bacterie *Mycobacterium tuberculosis*. Deze bacterie wordt verspreid door de lucht in kleine druppeltjes die ontstaan als mensen met een actieve infectie hoesten. Een infectie met deze bacterie kan in 5-10% van de gevallen een longinfectie veroorzaken. Met name bij mensen met een verzwakt immuunsysteem kan TBC leiden tot de dood. In totaal overleden er in 2016 meer dan 1.8 miljoen mensen aan TBC. Er wordt geschat dat ongeveer een derde van de wereldbevolking de bacterie bij zich draagt. Echter, het gaat hier veelal om latente vormen van de tuberculose bacterie.

De behandeling van een TBC infectie is complex. Dit komt onder andere omdat de bacterie een unieke celwand heeft die veel antibiotica, die tegen andere bacteriën wel werken, niet doorlaat (zie figuur 1). Ook heeft de bacterie een aantal mechanismen waarmee antibiotica weer naar buiten worden getransporteerd. Om behandeling nog lastiger te maken zit de bacterie ook nog eens verstopt in de immuuncellen van de gastheer. Dit vormt een extra barrière voor de behandeling met antibiotica. Als gevolg van deze complexiteiten duurt de behandeling van een TBC infectie minimaal zes maanden. In deze periode wordt een cocktail van vier antibiotica gegeven. Echter, in een toenemend aantal patiënten worden er bacteriën gevonden die resistent zijn tegen één of meer van deze antibiotica. Als gevolg hiervan neemt de behandelingsduur toe tot 24 maanden voor zogeheten multi-drug resistente TBC (MDR-TB) en tot zelfs tot 48 maanden voor extreme-drug resistente TBC (XDR-TB). Vanwege de toename in resistentie wordt het steeds lastiger om patiënten goed te kunnen behandelen. Bovendien brengt de lange behandeling van MDR- en XDR-TB veel vervelende neveneffecten voor de gezondheid van de patiënt met zich mee. Mede daardoor is de kans op overleving van een infectie met MDR- of XDR-TB respectievelijk 40% voor MDR-TB en slechts 20% voor XDR-TB. Het is daarom erg belangrijk om nieuwe soorten antibiotica te vinden, waar we deze groep patiënten mee kunnen behandelen.



Figuur 1. De celwand van mycobacteriën bevat meerdere complexe lagen met veel hydrofobe

(waterafstotende) componenten. De buitenste laag is het zogenaamde kapsel, dat voornamelijk uit suikers bestaat. De buitenmembraan bestaat uit verschillende lipiden. Deze zijn met de verschillende kleuren aangegeven. Verder onderscheiden we de structurele lagen die het buitenmembraan verankeren aan binnenmembraan: arabinogalactaan en peptidoglycaan, alsmede de lipomannaan. De binnenkant van de bacterie heet het 'cytosol'. Al deze lagen dragen bij aan de barrière die antibiotica-behandeling compliceren.

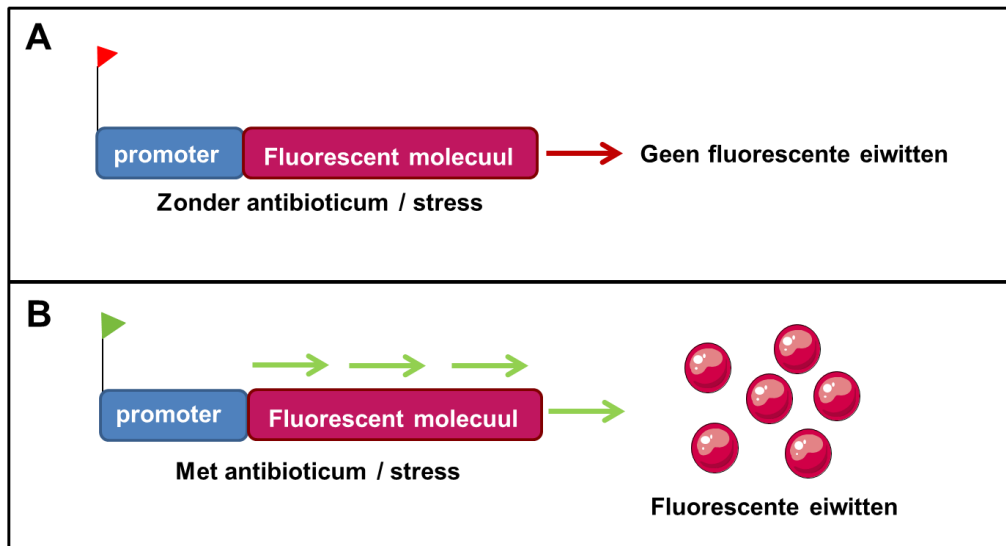
Wat was het doel van dit onderzoek?

Het zoeken naar antibiotica tegen *M. tuberculosis* gebeurt vaak door het testen van een grote verzameling van chemische stoffen. Stoffen die de bacterie doden worden als interessant gezien, doorontwikkeld, verder getest in dieren en uiteindelijk in mensen. Deze methode noemen wij een levend-dood screen. Echter, deze manier van antibiotica-ontdekking is al vaak gebruikt en levert slechts in zeldzame gevallen een veelbelovend middel op. Het doel van dit onderzoek was daarom om te kijken of we de reactie van de bacterie op stresscondities, zoals blootstelling aan de bestaande antibiotica, konden gebruiken als blauwdruk voor het vinden van nieuwe stoffen. Als je bijvoorbeeld ziet dat een bacterie reageert op een antibioticum dat de celwand stukmaakt door een eiwit te maken dat de celwand weer repareert, dan kun je dit de productie van dit eiwit gebruiken om celwandschade te meten. Dit doen wij door te kijken naar hoe vaak de code van dit eiwit van het DNA wordt afgeschreven naar RNA (wat vervolgens tot eiwit vertaald wordt). Als je dan nieuwe stoffen test en deze meting voor elke stof doet, kun

je inschatten in welke mate de stof celwand schade induceert. Want als de hypothetische nieuwe stof ook deze reactie teweegbrengt (oftewel de celwand weer repareert), dan weet je dat deze nieuwe stof waarschijnlijk de celwand aantast en dat het gaat om een stof die de potentie heeft om een succesvol antibioticum te worden. Met deze techniek vind je zowel stoffen die de bacterie doden alsook stoffen die de bacterie niet doden, maar vooral gestrest maken. Hiermee verkrijg je veel meer kwalitatieve informatie uit je bibliotheek van stoffen dan met de klassieke levend-dood testen. Door het bestuderen van deze stress reacties hopen wij meer geschikte antibiotica te vinden in de strijd tegen TBC.

Gebruikte onderzoeksmethodes

Om te meten hoe bacteriën reageren op stress hebben wij onderzocht wat de bacterie op verschillende tijdstippen ervaart na blootstelling aan antibiotica die in de kliniek worden gebruikt. Ook hebben wij gekeken naar andere typen stress, zoals laag fosfaat en stress in een belangrijk metabolisme-complex van de bacterie (oxidatieve fosforylering). Wij hebben specifiek onderzocht welke genen de tuberculose bacterie tot expressie brengt bij elke conditie. Deze informatie hebben wij vervolgens gebruikt om specifieke ‘reporters’ te maken voor een bepaald type antibioticum of een bepaald type stress. Deze reporters bevatten het stuk voor het gen dat bijvoorbeeld reageert op de blootstelling van de antibiotica, de zogeheten promotor. De promotor van een gen zorgt ervoor dat het gen (DNA) uiteindelijk kan worden afgeschreven naar een eiwit. Echter, wij hebben de code die normaal achter de promotor zit (het gen) vervangen door de DNA-code van een fluorescent eiwit. Door deze truc krijgen we uiteindelijk, na blootstelling aan antibiotica een meetbaar, fluorescent eiwit (zie figuur 2). De hoeveelheid van dit eiwit kunnen we meten en zo kunnen wij specifiek een reactie kwantificeren. Wij hebben voor drie soorten antibiotica op deze wijze een reporter gemaakt. Zo kunnen wij celwand schade, DNA schade en ook verstoringen meten in het proces dat eiwitten produceert.



Figuur 2. Een schematische weergave van het reporter-principe dat wij in deze studie hebben gebruikt. In A is de situatie getekend waar geen antibiotica aan de bacterie wordt toegevoegd of een andere stress-conditie zoals laag fosfaat afwezig is. Er zal dan geen activiteit zijn van de promoter en dus zullen er geen fluorescente eiwitten worden gemaakt. In panel B kun je zien wat er gebeurt als er wel een antibioticum wordt toegevoegd of wanneer er wel een type stressreactie in de bacterie plaatsvindt. Het gen van het fluorescente molecuul wordt dan afgeschreven en uiteindelijk leidt dit tot productie van een fluorescent eiwit. Per type antibioticum is de stress reporter volgens dit zelfde principe, alleen is de promoter (blauwe regio) anders voor elk type antibioticum, of het type stress wat wij gebruikt hebben.

Het meten van de stress als gevolg van antibiotica hebben wij uitgevoerd voor de tuberculose bacterie (*M. tuberculosis*), maar ook voor de nauwverwante soort *Mycobacterium marinum*. Wij hebben de *M. marinum* bacterie gebruikt omdat de bacterie die tuberculose in mensen veroorzaakt gevaarlijk is om mee te werken. Bovendien deelt deze bacterie zeer langzaam, maar eens per etmaal, mede daarom de keuze voor de *M. marinum*. Deze laatste bacterie veroorzaakt een tuberculose-achtige ziekte in vissen. Een bijkomend voordeel is dat we deze bacterie kunnen testen in een zebrafish embryo model dat wij op onze afdeling hebben. Zo kunnen wij direct de effecten van ons onderzoek testen.

Resultaten van dit proefschrift

In **hoofdstuk 2** beschrijven we de vondst van nieuwe genen die betrokken zijn bij het aanmaken van het kapsel van de bacterie (zoals aangegeven in figuur 1). Door gebruik te maken van een techniek die willekeurige mutaties maakt in genen van de bacterie (zogenoemde transposon-mutagenese), hebben wij bacteriën die meer, maar ook bacteriën die minder kapsel aanmaakten gevonden. Wij stelden vast dat een groot aantal van de mutanten die meer kapsel maakten te herleiden waren naar een systeem dat fosfaat kan importeren vanuit de omgeving. Hiermee vonden wij een directe link tussen hoeveelheden fosfaat en de

dikte van het bacteriële kapsel: lage hoeveelheden fosfaat zorgen voor een dik suiker-kapsel. Bovendien hebben we door het gebruik van stress reporters kunnen aantonen dat deze lage hoeveelheden fosfaat ook te vinden zijn in de bacterie tijdens een infectie in ons zebrafish embryo model.

In **hoofdstuk 3** beschrijven wij een drietal genen die het hoogste tot expressie komen bij behandeling met antibiotica die tegen de celwand gericht zijn: het zogenaamde *iniBAC* operon, bestaande uit de genen *iniB*, *iniA* en *iniC*. Omdat er weinig over deze genen bekend was hebben wij gekeken naar de genen die een rol spelen in de expressie van dit operon. Dit hebben wij wederom gedaan door middel van bovengenoemde transposon-mutagenese in een bacterie met onze reporter stam. Bacteriën die als gevolg van een mutatie een hoge expressie hadden van de *iniBAC* genen, en dus hoog fluorescent waren, hebben wij nader bestudeerd. We stelden vast dat de mutaties voornamelijk te herleiden waren naar het defect van een enkel enzym. Dit enzym, MutAB, speelt een rol bij afbreken van vetten en zorgt ervoor dat deze afbraakproducten opnieuw kunnen worden gebruikt om nieuwe celwand-onderdelen te maken. Deze vondst zorgt voor een link tussen de celwand antibiotica en de expressie van de drie *iniBAC* genen.

In **hoofdstuk 4** zijn we verder op zoek gegaan naar genen die een rol spelen bij de expressie van *iniBAC*. Hiervoor hebben wij een mutant gebruikt die een hoge expressie van *iniBAC* heeft en tevens dus ook hoog fluorescent is. In deze mutant hebben wij een tweede serie van willekeurige mutaties aangebracht. Vervolgens hebben wij gezocht op mutanten die niet meer fluorescent zijn en dus geen stress meer hebben. Naast een aantal andere mutaties hebben wij een gen gevonden dat de expressie van de *iniBAC* genen direct kan beïnvloeden. Dit gen hebben wij IniR genoemd (**IniBAC Regulator**). Bovendien laten wij in dit werk zien dat toediening van een specifiek suiker, trehalose ook tot expressie van *iniBAC* kan leiden. Trehalose is belangrijk voor de tuberculosebacterie, het is onderdeel van veel lipiden in de buitenmembraan,

In **hoofdstuk 5** hebben we geprobeerd te achterhalen wat de functie is van de IniBAC eiwitten. We dachten dat deze eiwitten misschien een complex zouden vormen dat nodig is om met celwandstress om te gaan. We hebben gekeken naar waar de IniA en IniC eiwitten zich in de cel bevinden en kwamen tot de observatie dat IniA aan het binnenmembraan verbonden is en IniC in het cytosol zit (zie figuur 1 voor deze locaties). Tevens ontdekten wij dat na behandeling met antibiotica die de celwand aantasten hoge hoeveelheden IniB wordt geproduceerd. Dit eiwit wordt ook deels over de binnen en buitenmembraan geëxporteerd en is buiten de bacteriële cel te vinden. We hebben met mutanten in deze export-systemen, ook wel secretie-systemen genoemd, gekeken of we een mechanisme voor deze secretie konden vinden. Daarmee hebben wij een aantal belangrijke kandidaten uitgesloten, maar helaas niet het verantwoordelijke secretie systeem ontdekt.

In **hoofdstuk 6** hebben we gekeken naar de antibioticum stress reactie van zowel *M. tuberculosis*, de veroorzaker van humane TBC, als *M. marinum*, de veroorzaker van TBC in vissen. Wij hebben vijf

verschillende antibiotica gebruikt. Dit zijn antibiotica die ook voor behandeling van TBC in de kliniek worden gegeven. We hebben na 4 uur en 24 uur gemeten welke genen de bacterie tot expressie bracht in reactie op de antibiotica (door middel van zogeheten RNA sequencing). We zagen dat deze reactie in *M. marinum* een specifieke vingerafdruk opleverde per type antibioticum en dus per type schade dat het antibioticum veroorzaakte. Vervolgens hebben we een serie stress reporters gemaakt en laten wij zien dat deze reporters inderdaad reageren op hetzelfde type antibioticum als waar zij mee gevonden waren in de RNA sequencing. Tot slot hebben we een verzameling van chemische stoffen getest. Het gaat om stoffen die actief zijn tegen de tuberculosebacterie, maar waarvan niet bekend is wat voor type schade zij toebrengen. Met onze reporters hebben we drie moleculen gevonden, waarvan er twee celwand schade veroorzaken en één stof die waarschijnlijk DNA schade veroorzaakt.

In **hoofdstuk 7** hebben we een stress reporter gebruikt om te kijken naar de expressie van een belangrijk component in de ademhalingsketen van de mycobacteriën: cytochroom bd. We hebben gevonden dat een aantal antibiotica de expressie van cytochroom bd verhogen. Naast antibiotica hebben we gekeken naar de expressie van dit complex in cel-infecties en in ons zebravis embryo model. In beiden experimenten zagen we dat de expressie van dit complex van nature al erg hoog is. Dat betekent waarschijnlijk dat het complex een essentiële rol speelt gedurende infectie. Dit maakt cytochroom bd tot een interessant doelwit om nieuwe antibiotica tegen te ontwikkelen.

Conclusie

Met dit onderzoek hebben wij meer inzicht gekregen in de reactie van mycobacteriën na blootstelling aan antibiotica. Bovendien hebben wij een bijdrage geleverd aan het karakteriseren van stressreacties ten gevolge van laag fosfaat en verandering in de ademhalingsketen van de bacterie. Met deze inzichten denken wij een concreter beeld te hebben van de bacterie tijdens stress condities. Tevens denken wij nieuwe doelwitten te hebben gevonden die de ontdekking van nieuwe antibiotica kan stimuleren. Dit is een belangrijke stap in de zoektocht naar nieuwe middelen tegen de tuberculosebacterie.